

EFIKASI LIMBAH SAGU SEBAGAI SUBSTRAT KAYA NUTRISI UNTUK MIKROALGA ISOLAT LIPI11-2-AL002 [Sago Waste Efficacy as Nutrition Rich Substrate for Microalgae LIPI11-2-AL002 Isolate]

Dwi Susilaningsih^{1✉}, Sari Lestari², Kusnadi², Topik Hidayat², Hani Susanti¹

^{1*)} Laboratorium Bioenergi dan Bioproses, Bidang Bioproses, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI,
Jalan Raya Bogor KM 46, Cibinong 16911, Bogor, Jawa Barat.
e-mail: dwisusilaningsih@yahoo.com.sg

²⁾ Jurusan Pendidikan Biologi, FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung. Tlp./Fax 2001937

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic microorganisms that have potential to produce some useful chemical substances such as carbohydrates, proteins, and lipids. Microalgae are also known exhibited ability as a bioremediation agent. This report is emphasized on analyzing the growth rate and nutritional content of microalgae including carbohydrate, protein and lipid from selected isolates LIPI11-2-AL002 that treated with sago waste. Microalgae were cultivated into hydrolysed sago “ampas” at the concentration of 0,50, 500,5000 ppm, and medium AF-6 (as control culture) respectively. Therefore selected microalgae isolate was cultivated in series of cultivation volume start from 100 mL until 5 Liter media gradually. Observed parameters were covered cell viability (growth) and proximate content of biomass including carbohydrate, lipid and protein content. The results showed that the carbohydrate and protein content in the algal biomass was increase along the addition of series sago “-ampas” concentration. The highest concentration of addition the sago ampas is 5000 ppm which is limit for the algal survival. In the highest treatment of sago waste the algal proximate contents were 261.09 ppm of carbohydrate, 5.12 ppm of protein and 3.61% per of lipid dry weight respectively. In addition, the toxicity effect of fermentation product was not appeared in a toxicity test using gold fish komet (*Carassius auratus*).

Keywords: Microalgae, sago waste, carbohydrates, proteins, lipids

ABSTRAK

Mikroalga merupakan mikroorganisme fotosintetik yang berpotensi menghasilkan substansi kimia bermanfaat seperti karbohidrat, protein dan lipid. Mikroalga juga diketahui berfungsi sebagai agen bioremediasi. Laporan penelitian ini ditekankan pada analisis pertumbuhan dan kandungan nutrisi mikroalga yaitu karbohidrat, protein dan lipid dari isolat LIPI11-2-AL002 yang diberi perlakuan limbah sagu. Mikroalga dikultivasi dalam ampas sagu yang telah dihidrolisis dengan variasi konsentrasi 0, 50, 500 dan 5000 ppm, dan dalam media AF-6 untuk kultur kontrol. Kultivasi dilakukan secara bertahap dari 100 ml hingga 5 liter. Parameter yang diamati adalah viabilitas sel (pertumbuhan) dan proksimat biomassa meliputi kandungan karbohidrat, lipid dan protein. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan karbohidrat dan protein dalam biomassa mikroalga meningkat sepanjang penambahan variasi konsentrasi ampas sagu. Kandungan proksimat tertinggi yang dicapai melalui pemberian ampas sagu selama kultivasi adalah 261.09 ppm karbohidrat, 5.12 ppm protein dan 3.61 % lipid dalam setiap berat kering biomassa. Selanjutnya diperoleh informasi bahwa limbah yang diolah menggunakan mikroalga LIPI11-2-AL002 tidak menyebabkan kematian pada uji toksisitas menggunakan ikan mas komet (*Carassius auratus*).

Kata kunci: mikroalga, hampas sagu, karbohidrat, protein, lipid

PENDAHULUAN

Mikroalga merupakan mikroba fotoautotrof yang memiliki diversitas yang sangat besar dan jangkang hidup yang luas. Mikroalga telah diketahui menghasilkan banyak substansi kimia atau senyawa yang berguna untuk manusia dan lingkungannya termasuk sumber energi. Menurut Kong *et al.* (2011) mikroalga merupakan sumber potensial penghasil biodiesel dan bahan-bahan berguna lainnya (seperti pigmen, protein dan asam lemak). Beberapa jenis mikroalga yang diproduksi secara komersil di dunia adalah jenis *Spirulina* sp., *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis* sp., dan *Haemotococcus*. Beragam jenis mikroalga lain masih dalam tahap

penelitian untuk diketahui nilai manfaatnya termasuk mikroalga untuk energi yang saat ini baru sekitar 100 jenis termanfaatkan dari 25.000 jenis yang diperkirakan ada di dunia (Maryanto dkk, 2013).

Sebagai negara maritim yang beriklim tropis, keragaman mikroalga di Indonesia sangat tinggi yang terkoleksi dari kawasan tropikal, deret gunung berapi, pertemuan empat arus laut dan ragam ekologi yang unik. Mikroalga di Indonesia sudah dimanfaatkan sebagai bioaktif farmasi dan kosmetik, suplemen makanan dan kesehatan, pakan akuakultur dan bioenergi. Salah satu kendala dalam pemanfaatan baik berupa biomassa maupun metabolit yang berasal dari mikroalga adalah media kultivasi yang cukup mahal

sehingga dibutuhkan inovasi sumber media pertumbuhan baru yang murah, mudah diperoleh dan tersedia cukup melimpah.

Sementara itu, sebagai negara tropis Indonesia kaya akan sumber substrat baik berupa limbah maupun non limbah. Salah satunya adalah potensi perkebunan yang memiliki permasalahan berupa buangan limbah organik. Proses penerasan dan ekstraksi sagu menghasilkan sampingan ampas sagu yang melimpah dan belum dimanfaatkan secara optimal. Permasalahan yang ditimbulkan oleh limbah sagu terhadap lingkungan apabila dibuang langsung ke badan perairan atau ditimbun adalah proses pembusukan yang berlangsung yang menyebabkan bau busuk dan berubahnya kejernihan air. Limbah ini sebenarnya dapat dimanfaatkan sebagai sumber pakan, substrat fermentasi atau energi karena kandungan ampas sagu sebagian besar terdiri atas lignin dan selulosa. Komponen tersebut juga diduga dapat dimanfaatkan untuk substrat mikroalga atau mikroba lainnya sebagai penyulih sumber karbon dalam mediana.

Penelitian ini memfokuskan pada adaptasi mikroalga hijau-biru pada media berlimbah sagu dan diharapkan mikroalga tersebut dapat memanfaatkan selulosa dan lignin pada limbah untuk keperluan hidupnya sebagai sumber karbon. Informasi hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu pemecahan persoalan membuang limbah sagu yang dimanfaatkan sebagai media pertumbuhan mikroalga. Biomassa mikroalga yang dipanen diharapkan mempunyai nilai proksimat dan yield lebih baik. Manfaat lain yang diperoleh berupa solusi terintegrasi antara upaya mengurangi dampak pencemaran lingkungan oleh limbah agro-industri sekaligus budidaya/kultivasi mikroalga dengan biaya produksi yang lebih rendah, serta mendapat biomassa yang bernutrisi tinggi.

BAHAN DAN CARA KERJA

Preparasi media kultur

Limbah ampas sagu, yang diperoleh dari PT. Sampoerna Agro, dijadikan sebagai media kultur

dengan cara menambahkan ampas sagu konsentrasi 50, 500, 5000 mg ampas sagu setiap 1 Liter akuades. Limbah sagu tersebut selanjutnya dihidrolisis dengan pemanasan pada suhu 120 °C selama 15 menit. Sebagai media kontrol adalah Media AF-6. Komposisi media AF-6 dalam 100 mL adalah 14 mg NaNO₃, 2,2 mg NH₄NO₃, 3 mg MgSO₄.7H₂O (Himedia; RM864), 1 mg KH₂PO₄, 0,5 mg K₂HPO₄, 1 mg CaCl₂.2H₂O (Merck; 1.02382.1000), 0,2 mg Fe-Citrate, 0,2 mg asam sitrat (Merck; 1.00244.0500) 0,2 µg biotin, 1 µg Tiamin HCl, 0,1 µg Vit B₆, 0,1 µg Vit B₁₂, dan 0,5 mL PIV *metals*.

Observasi dan Kultivasi Mikroalga

Isolat yang digunakan adalah LIPI11-2-AL002 karena merupakan salah satu koleksi mikroalga yang mudah tersuspensi dalam media pertumbuhan sehingga diharapkan mudah dalam proses kultivasi dan analisis pertumbuhannya. Isolat tersebut merupakan koleksi biakan murni mikroalga Cyanobacteria di Laboratorium Bioenergi dan Bioproses, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI yang berasal dari Pulau Lombok, NTB. Mikroalga terseleksi dikarakterisasi melalui pengamatan mikroskopik. Isolat diinokulasikan sebanyak 100 mL/L ke dalam kultur media pertumbuhan AF6 yang ditambahkan ampas sagu masing-masing 50, 500, 5000 ppm hingga mencapai volume 5 L.

Faktor lingkungan yang diamati meliputi suhu kultur (thermometer, Horiba D-55S), pH kultur (Horiba D-55S), dan intensitas cahaya kultur (luxmeter, Fisher Scientific CZ2) pada pagi, siang, dan sore.

Pertumbuhan diamati dengan pengukuran kekeruhan sel oleh biomassa (densitas sel) pada absorbansi λ 680 nm (spektrofotometer, SHIMADZU UV-1700) setiap hari dengan 3 kali pengulangan.

Kandungan Proksimat

Proksimat mikroalga yang berupa karbohidrat, protein dan lipid sel secara bertahap dianalisis tiap 5 hari pada masa kultivasi. Kandungan karbohidrat dianalisis berdasarkan metode modifikasi Phenol-Sulphuric acid (Dubois *et al.*, 1956). Kandungan protein diukur menggunakan metode modifi-

kasi Bradford (Bradford, 1976). Sedangkan kandungan lipid mikroalga dianalisis dengan metode modifikasi Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959).

Analisis Data

Analisis data pengaruh penambahan limbah terhadap nilai proksimat (protein, karbohidrat, dan lipid) mikroalga dilakukan dengan pendekatan two-way anova SPSS.22 (statistical product and service solutions), dilanjutkan dengan uji Duncan's pada taraf uji 5% untuk melihat ada tidaknya perbedaan signifikan antar perlakuan (Mattjik dan Sumertajaya, 2006).

Uji Awal Toksisitas pada Ikan

Sejumlah ikan mas komet (*Carassius auratus*) ditempatkan dalam residu media yang mengandung limbah 50, 500 dan 5000 ppm yang telah diolah dengan mikroalga. Kematian ikan dicatat selama uji toksisitas berlangsung.

HASIL

Observasi Isolat mikroalga

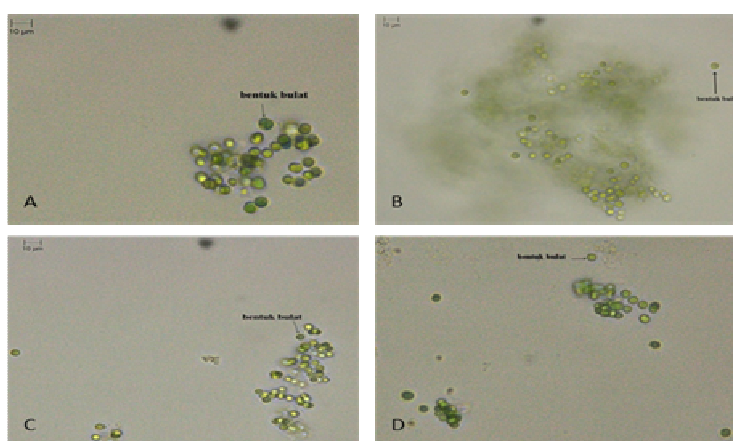
Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya menunjukkan bahwa mikroalga terpilih mempunyai ciri-ciri berwarna hijau kebiruan, tidak ditemukan adanya inti sel, kloroplas dan material sel berserakan, sehingga alga tersebut dikelompokkan Blue-green algae (cyanobacteria). Bentuk sel isolat LIPI11-2-

AL002 adalah bulat dengan diameter kurang dari 10 μm (Gambar 1.). Sel cenderung berkumpul satu sama lain namun tidak berkoloni, dan berwarna hijau biru. Besar Sel pada kontrol (tidak ditambahkan ampas sagu) memiliki ukuran diameter yang lebih besar dibandingkan kultur yang ditambahkan ampas sagu. Pergerakan sel seiring dengan arus yang terjadi pada lingkungannya. Pengamatan ini menunjukkan kecenderungan alga ini termasuk kelompok *Synechocystis* yang dicirikan dengan sel yang soliter yang cenderung berbentuk bulat, tidak berfilamen, dan membentuk agregat.

Adaptasi Mikroalga pada Limbah Sagu

Parameter lingkungan yang diamati meliputi kualitas dan kuantitas nutrisi, cahaya, pH dan temperatur. Hasil pengamatan ditunjukkan oleh tabel 1. Rata-rata cahaya yang diterima oleh kultur adalah 1.300-27.500 lux, fluktuasi pH antara 8-9 dan temperatur yang relatif stabil 31-32 $^{\circ}\text{C}$.

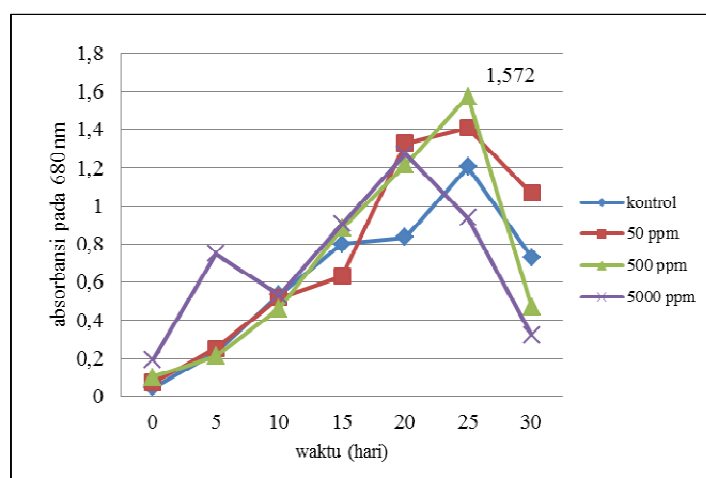
Faktor utama adalah daya tumbuh mikroalga yang ditunjukkan dengan pertambahan jumlah sel atau biomassa. Hasil pengamatan pertumbuhan alga LIPI11-2-AL002 pada limbah sagu menunjukkan pertumbuhan tertinggi adalah 1,572 (UV absorbansi λ 680 nm) dalam perlakuan pemberian limbah sagu 500 ppm pada hari ke-25 (gambar 2).



Gambar 1. Morfologi isolat LIPI11-2-AL002. A; kontrol, B; LIPI11-2-AL002 ditambah limbah 50 ppm, C; LIPI11-2-AL002 ditambah limbah 500 ppm dan D; LIPI11-2-AL002 ditambah limbah 5000 ppm. Perbesaran 40x. (morphology of LIPI11-2-AL002 isolate (A; control, B; culture of LIPI11-2-AL002 with addition of 50 ppm of waste, C; culture of LIPI11-2-AL002 with addition of 500 ppm of waste, D; culture of LIPI11-2-AL002 with addition of 5000 ppm of waste. Magnificent 40x)

Tabel 1. Rata-rata faktor lingkungan selama kultivasi isolat LIPI11-2-AL002 (*Average environment factors along cultivation of LIPI11-2-AL002 isolate*).

Konsentrasi limbah (<i>waste concentration</i>) (ppm)	Temperatur kultur (<i>culture temperature</i>) (°C)	pH kultur (<i>culture pH</i>)	Intensitas cahaya (<i>light intensity</i>) (lux)		
			Pagi (<i>morning</i>) (08.00 WIB)	Siang (<i>noon</i>) (12.00 WIB)	Sore (<i>afternoon</i>) (16.00 WIB)
0	31	8	275x100	131x100	13x100
50	31	9	275x100	131x100	13x100
500	31	8	275x100	131x100	13x100
5000	32	8	275x100	131x100	13x100

**Gambar 2.** Rerata pertumbuhan sel mikroalga LIPI 11-2- A1002 pada perlakuan penambahan limbah sagu. (*Cell growth average of microalgae LIPI-11-2-A1002 during addition of sagu waste*)

Kandungan Proksimat Mikroalga

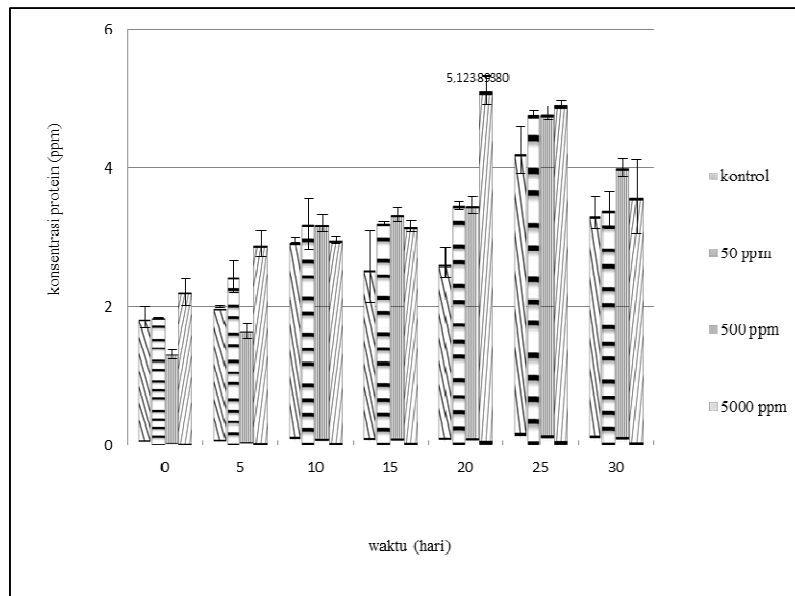
Pengamatan kandungan proksimat biomassa mikroalga yang berupa karbohidrat, protein dan lipid ditunjukkan pada gambar 3, 4 dan 5.

Kultivasi dalam limbah. Sintesis tertinggi protein terjadi pada hari ke 20 dalam perlakuan penambahan 5000 ppm limbah. Secara umum sintesis protein dalam sel LIPI11-2-AL002 semakin bertambah. Diketahui pada hari ke-25 merupakan puncak kandungan protein tertinggi kecuali kultur dengan penambahan 5000 ppm limbah. Sintesis protein pada semua perlakuan mengalami penurunan di hari ke-30. Protein tertinggi dihasilkan oleh kultur dengan penambahan limbah 5000 ppm di hari ke-20 sebesar 5,123 ppm. Sementara kultur kontrol, 50 ppm, 500 ppm dan 5000 ppm menghasilkan protein tertinggi

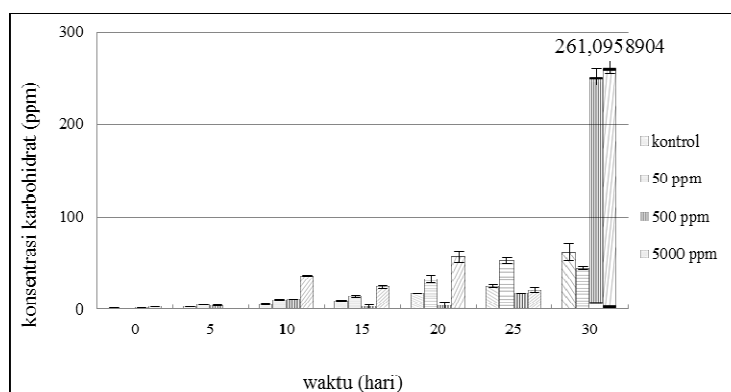
di hari ke-25 masing-masing sebesar 4,26 ppm, 4,77 ppm, 4,79 ppm dan 4,929 ppm (gambar 3).

Pembentukan karbohidrat pada seluruh perlakuan terlihat lambat atau rendah selama masa kultivasi (gambar 4). Kandungan karbohidrat mengalami kenaikan yang signifikan di hari terakhir masa kultivasi (hari ke-30) yang ditunjukkan pada penambahan limbah sagu 500 dan 5000 ppm sebesar 250 hingga 261,095 ppm total gula tereduksi dalam sel.

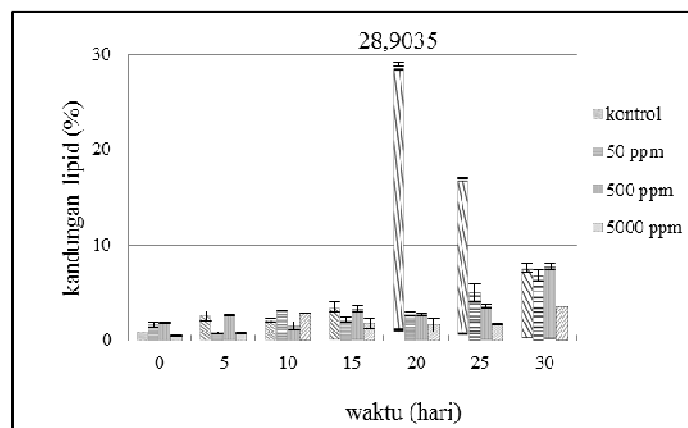
Pembentukan lipid terlihat sangat fluktuatif dan bervariasi dari berbagai perlakuan (gambar 5). Konsentrasi lipid tertinggi ditunjukkan oleh kultur pada media AF-6 (kontrol, tidak ada penambahan limbah) sebesar 28,903% per berat sel pada hari ke-20. Terlihat kecenderungan pada semua perlakuan membentuk sedikit senyawa lipid pada sel atau bio-



Gambar 3. Konsentrasi protein dari kultur isolat LIP111-2-AL002 pada konsentrasi limbah berbeda (*Protein concentration of LIP111-2-AL002 culture on different waste concentration*)



Gambar 4. Konsentrasi karbohidrat dari kultur isolat LIP111-2-AL002 pada konsentrasi limbah berbeda (*Carbohydrate concentration of LIP111-2-AL002 culture on different waste concentration*)



Gambar 5. Konsentrasi lipid dari kultur isolat LIP111-2-AL002 pada konsentrasi limbah berbeda (*lipid concentration of LIP111-2-AL002 on different waste concentration*)

masanya.

Hasil Analisis Data

Hasil uji ANOVA menunjukkan pengaruh penambahan limbah pada kultur mikroalga LIPI11-2-AL002 yang diintegrasikan dengan interaksi waktu kultivasi adalah berbeda nyata ($p < 0,05$) pada seluruh hasil uji proksimat baik karbohidrat (glukosa), protein dan lipid.

Uji Awal Toksisitas

Selama uji toksisitas berlangsung, tidak ditemukan kematian ikan uji yang dipaparkan pada residu media yang mengandung limbah.

PEMBAHASAN

Pengamatan morfologi sel LIPI11-2-AL002 menunjukkan bahwa kemungkinan terdekat secara fenotipik adalah jenis *Synechocystis* yang dicirikan dengan berbentuk bulat, soliter dan tidak mempunyai membran sel sebenarnya serta inti sel (Ripka, 1988). Namun demikian perlu diadakan penelitian lanjutan guna menentukan strain dari isolat tersebut karena sejatinya sianobakteria dicirikan oleh faktor karakter morfologi, biokimia dan fisiologi selnya bahkan materi genetiknya (Wilmotte dan Golubic, 1991). Jenis *Synechocystis* mempunyai karakter seperti bakteri gram negatif yaitu mampu mereduksi sulfur dan hidup dalam kondisi hiper-termofilik sehingga dapat bertahan pada kondisi ekstrim seperti di dalam gua, laut dalam, vulkano dan limbah. Berdasarkan pertimbangan inilah LIPI11-2-AL002 yang mendekati *Synechococcus* diujicobakan untuk diadaptasikan dengan limbah sagu yang selama ini belum tertangani secara optimal. Biomassa atau sel *Synechococcus* sendiri mempunyai komposisi dominan protein, glikoprotein, dan sedikit lipida dan karbohidrat. Senyawa-senyawa ini sangat bermanfaat untuk sumber suplemen gizi pada pakan dan pangan. Diharapkan dengan berkembangnya teknologi budidaya *Synechococcus* pada limbah sagu akan mengurangi pencemaran lingkungan akibat buangan limbah tersebut dan menghasilkan biomassa berprotein tinggi yang dapat dimanfaatkan untuk bahan pakan atau keperluan lainnya.

Morfologi sel yang diamati menunjukkan

bahwa sel-sel mikroalga yang ditumbuhkan pada limbah cenderung lebih kecil dan membentuk lapisan berlendir lebih banyak dibanding dengan kontrol (gambar 1; A-D). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh faktor stress lingkungan oleh keberadaan limbah yang menyebabkan kekeruhan dan bertambahnya partikel sulit larut di dalam media sehingga cahaya dan karbondioksida yang dibutuhkan tidak tercukupi atau sumber karbon yang terbatas. Keterbatasan inilah yang menyebabkan sianobakteria menggunakan material yang ada disekitarnya untuk dimanfaatkan sebagai substrat atau sumber kehidupannya. Sejalan dengan ujicoba Vasconcelos dan Pereira (2001) yang menggunakan kemampuan sianobakteria sebagai produsen primer perairan untuk merekoveri limbah perkotaan di Portugal yang berhasil dengan baik yaitu dapat mereduksi bau, suspensi material organik dan kekeruhan perairan.

Kemampuan beradaptasi LIPI11-2-AL002 dalam lingkungan limbah diamati dengan mengukur aktifitas metabolisme sel berupa pertumbuhan sel, pembentukan komponen dasar kehidupan sel yaitu protein, karbohidrat dan lipida. Hasil penelitian menunjukkan bahwa mikroalga tersebut mampu bertahan hidup hingga penambahan limbah sagu terurai sampai konsentrasi total 5000 ppm dalam medium. Pola tumbuh mikroalga terus meningkat dari hari ke hari pada masa kultivasi yang mengindikasikan terjadi pembelahan sel dan proses metabolisme sel atau viabilitas sel (daya hidup), densitas sel maksimum diperoleh di hari ke-25 sebesar 1,572 (absorbansi λ 680 nm) pada penambahan limbah 500 ppm dari total volume media (grafik 1). Pada konsentrasi penambahan limbah di atas 5000 ppm pertumbuhan sel mikroalga telah terhambat dan tidak mampu untuk melakukan proses fotosintesa ataupun metabolisme sel.

Hasil pemantauan laju kenaikan kandungan protein ditemukan bahwa selama kultivasi baik kontrol maupun perlakuan pada limbah mengalami kenaikan setiap harinya, begitu juga dengan karbohidrat. Namun untuk kandungan lipida terlihat terjadi kenaikan laju penambahan setelah masa kultivasi 25 hari atau telah mengalami fase pertumbuhan

stasioner ataupun mulai mati. Hal ini sejalan dengan kaidah pola tumbuh sel yang akan didominasi oleh komposisi protein dan karbohidrat pada masa tumbuh dan akan mengakumulasi lemak atau lipida setelah sel membutuhkan fase bertahan dari penuaan dan kematian (Gambar 3, 4 dan 5).

Hasil analisis data (ANOVA) menunjukkan secara signifikan bahwa kenaikan kandungan protein dan karbohidrat dalam sel alga berbanding lurus dengan penambahan substrat ampas sagu. Hal ini memberikan gambaran bahwa protein dan karbohidrat dibentuk lebih dahulu dalam proses fotosintesis dan disimpan sebagai cadangan makanan. Substrat karbon yang jumlahnya cukup banyak pada limbah sagu dimanfaatkan secara baik oleh alga tersebut baik pada proses fototrof maupun heterotrof (gelap).

Perlakuan ujicoba ini disesuaikan dengan kondisi lingkungan baik pH, suhu dan cahaya (Tabel 1). Hal ini dilakukan untuk kepentingan aplikasi di lingkungan. Fluktuasi intensitas cahaya yang diperoleh berkisar 1.300 dan 17.500 lux perharinya. Sedangkan untuk suhu tidak terlalu besar perubahannya hanya sebesar 1 °C perbedaannya yaitu antara 31-32 °C. Begitu pula pH media ternyata tidak terlalu besar fluktuasinya. Selama uji toksisitas berlangsung, tidak ditemukan kematian ikan uji yang dipaparkan pada residu media yang mengandung limbah. Hasilnya menunjukkan bahwa 100% ikan tetap hidup selama pengujian toksisitas. Hal tersebut mengindikasikan bahwa residu medium tersebut aman bagi lingkungan sehingga hasil ini dapat dikatakan memenuhi salah satu tujuan penelitian yaitu mengurangi pencemaran dari limbah sagu.

KESIMPULAN

Limbah sagu dapat dijadikan sebagai media kultur sianobakteria LIPI11-2-AL002 dan mempunyai kemampuan menggunakan ampas sagu hingga konsentrasi 5000 ppm. Kandungan proksimat alga yang terlihat signifikan mengalami kenaikan dengan penambahan limbah sagu adalah protein dan karbohidrat sehingga biomasanya dapat dimanfaatkan sebagai bahan suplemen atau keperluan lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan kerjasama antara JST-JICA/NITE Jepang dengan LIPI Indonesia. Eksplorasi dan koleksi mikroalga didanai oleh proyek penelitian Kompetitif LIPI tahun 2011.

DAFTAR PUSTAKA

- Aziz SA, Adeni DSA, Bujang K and Hassan MA. 2009. Bioconversion of sago residue into value added products. *African Journal of Biotechnology*, **9** (14), 2016-2021
- Barsanti L and Gualtieri P. 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press, USA.
- Bellinger EG and Sigeo DC. 2010. *Freshwater Algae: Identification and use as Bioindicators*. Wiley-Blackwell, UK. ISBN 978-0-470-05814-5
- Bligh EG and Dyer WJ. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canada Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 911-917.
- Bradford MM. 1976. A Rapid and sensitive method for quantitation of protein utilising the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254
- Chen F and Wen ZY. 2003. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, **21**, 273-294
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F. 1956. Colorimetric method for Determination of Sugar and Related Substances. *Analytical Chemistry*, **28**, 350-356
- Endrawati H, Widianingsih dan Manullang C. 2012. Densitas dan Kandungan Total Lipid Mikroalga *Spirulina platensis* yang Dikultur pada Tingkatan Perbedaan Fotoperiod. *Journal of Marine Research*, **1**, 24-28
- Kong W, Xia C, Song H, Cao Y, Yang H and Hua S. 2011. The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation. *African Journal of Biotechnology*, **10**(55), 11620-11630
- Lee YK. 2004. Algal nutrition: heterotrophic carbon nutrition. In: Richmond A (ed) *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology*, 116-124. Blackwell, Oxford.
- Maryanto I, Joeni S.R, Sasa S.M, Wahyu D, Djauhar A, Siri R.A, Yopi S, dan Dwi S. 2013. *Bioresource untuk Pembangunan Ekonomi Hijau*. LIPI Press
- Mattjik, Ahmad Ansori dan Sumertajaya IM. 2006. *Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab*. IPB Press, Bogor.
- Po-Fung Ip and Chen F. 2005. Production of astaxanthin by the green microalgae *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochemistry*, **40**, 733-738
- Ripka R. 1988. Recognition and identification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology*, **167**, 28-67.
- Wan M, Liu P, Xia J, Rosenberg JN, Oyler GA, Betenbaugh MJ, Nie Z and Qiu G. 2011. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **91**, 835-84
- Wilmotte A and Golubic S. 1991. Morphological and genetic criteria in taxonomy of Cyanophyta/Cyanobacteria. *Algalological Studies*, **64**, 1-24
- Vasconcelos VM dan Pereira E. 2001. Cyanobacteria diversity and Toxicity in waste water treatment plant (Portugal). *Water Research*, **35**(5), 1354-1357.